



TITLE:

自由:32 霊長類の唾液シスタチンおよびシスタチン遺伝子群の比較研究(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

羽賀, 俊明; 水口, 清; 竹中, 修

CITATION:

羽賀, 俊明 ...[et al]. 自由:32 霊長類の唾液シスタチンおよびシスタチン遺伝子群の比較研究(Ⅲ 共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 1995, 25: 101-102

ISSUE DATE:

1995-11-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/164656>

RIGHT:

1. 子宮内膜に対する作用

銅付加IUDを装着された子宮内膜を組織学的に調べた結果、子宮内膜間質の増殖、マクロファージの増加、多核白血球の浸潤、毛細血管拡張が観察された。また、組織化学的には、内膜組織中プロスタグランディンEおよびFの増加、Mucosubstanceの増加が認められた。

2. 受精卵に対する作用

排卵後直ちに卵の回収を行うために、リアルタイムに判定が可能なELISAによる唾液中Progesterone測定法を開発し、これに基づき、卵を採取した。得られた卵を形態学的、細胞遺伝学的に検討した結果、すべての卵は未受精卵および変性卵であり、受精卵は採取できなかった。変性卵の出現頻度は約30%であった。

これらのことから、銅付加IUDが内膜への局所作用によって着床が阻害される可能性が示唆された。また、受精卵への作用については、受精卵採取ができなかったことから、可能性は否定できないものの、詳細は不明である。

自由 : 31

サル類における体外受精、胚培養および生殖細胞の長期保存に関する研究

山海 直 (国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター)

精子・卵子の凍結保存、体外受精、胚培養などは、数種のサルで成功している。マカク属ではアカゲザル、カニクイザルで報告されているが、ニホンザルでの報告は少なく、精子、卵子に関わる基礎データの蓄積が必要である。我々は、昨年度の本プロジェクト研究において、ニホンザルの凍結精子と卵胞卵を用いた体外受精に成功している。本年度は、これらの成績をさらに向上させて本技術を確立することを目的として、ニホンザル凍結融解精子についての基礎検討を行った。

1) 体外受精に関わる技術の再現性

卵子の採取、精子の採取、卵子・精子の犬山市からつくば市までの運搬、精子の凍結保存、体外受精、受精卵の発育培養について既報 (昨年度報告書) の方法で試みたところ、個体差を認めたものの本技術の再現性が確認された。

2) 凍結融解精子の性状

精巣上体精子の凍結保存において、融解後、活

性良好な精子を回収することに成功している。これらの精子を用いた体外受精においても受精を確認しているが、凍結融解精子の性状については不明な点が多い。今回、体外培養系を用いて凍結融解精子の生存性、活性、運動性などについて経時的に観察した。我々が開発したTTE希釈液を用いた方法で精子を凍結融解し、percoll洗浄した結果、生存率90%、活性+++の良好精子が回収できた。これらの精子を培養したところ、caffeineとdBC-AMPを含んだTYH mediumで培養したものは、培養30分ですでにhyperactivationを示す精子が認められた。しかし、3時間目以降、徐々に生存率、活性の低下が認められた。一方、caffeine、dBC-AMPを含まないmediumで培養した場合、長時間 (24時間以上) にわたって生存精子を確認することができたが、hyperactivationは認められなかった。今回の結果は、カニクイザルでの成績と類似するものであった。カニクイザルでは受精能獲得、先体反応などについて、詳細な成績を得ているが、ニホンザルにおいても同様の性状を有していることが強く示唆された。

自由 : 32

霊長類の唾液シスタチンおよびシスタチン遺伝子群の比較研究

羽賀俊明・水口 清 (東京歯科大・法歯)
竹中 修 (京都大・霊長研)

ヒトのシスタチン遺伝子 (CST) は遺伝子ファミリーを形成し、現在少なくとも7つの遺伝子座位が存在することが明らかにされており、唾液中にはこれらのうち5種の遺伝子産物が存在することが確認されている。しかし、非ヒト霊長類にこれらのどの種の遺伝子が存在し、どの遺伝子が発現されているかについては明らかにされていない。そこで、それぞれ2頭のオオガラゴ (Gc)、ミドリザル (Ca)、アカゲザル (Mm)、ニホンザル (Mfu)、マントヒヒ (Ph) の唾液及び血液、ワタボウシタマリン (So) 2頭の血液、カニクザル (Mfa) 1頭の唾液を用いて、唾液蛋白シスタチン及びシスタチン遺伝子群の比較をおこなった。唾液蛋白シスタチンは、ヒトのシスタチンS (CST4)、SA (CST2)、SN (CST1)、D (CST5) の電気泳動パターンと比較したところ、Ca、Gcおよび1頭のMfu (若桜) はシス

タチンSおよびSAに相当すると思われるバンドの位置が異なっていたが、その他はヒトと類似したパターンを示した。但しシスタチンSに相当するバンドはヒトと類似したパターンを示すものの、リン酸化したシスタチンSの位置により濃いバンドが認められた。またシスタチンSN及びDに相当するバンドは、易動度は多少異なるものの、全ての種の唾液から検出された。次にCST1、CST2、CST3（シスタチンC）、CST4、CST5のExon部分を含む領域のPCR増幅を試みたところ、MmからはCST2、CST3、CST4のExon3を含む部分が増幅され、塩基配列もヒトの各遺伝子と類似した配列を示した。またCST2のExon3領域は全ての種のDNAから増幅され、それらの塩基配列を比較すると、約160bpの範囲で、ヒト-Gc-Phの3者、またMm-Mfuの2者は同じ配列を示した。さらに、So-Mfu、Mm-Mfu、Mm-Mfu-Ca-So、ヒト-Ph-So-Gcにはそれぞれに共通する変異が存在し、Mm、Ph、Soにはヘテロを示す部位が存在した。以上の如くシスタチン遺伝子は霊長類に共通の遺伝子群が存在し、発現していると共に各遺伝子群の塩基配列は種により特徴を異にしていた。

自由：33

血管内皮細胞にあるSAチャンネルの性質の解明

長谷川 昇（名古屋文理短大）

本研究は、サルにおける血管内皮細胞のSAチャンネルが圧受容にどのような役割を果たしているのかを明らかにするために行われた。この課題は前年度からの継続の内容であり、本年度は、内皮細胞を培養し、パッチクランプ法を行い、チャンネルの機能を明らかにする目的で行われた。

方法

血管内皮細胞の培養；胸部大動脈の両端をクランプし、できるだけ無菌的に摘出し、冷却した。血管内の血液を洗浄後、血管軸方向に切開し、メス刃により剥離した後、ディッシュにまき培養した。培養液は、ヒト血管内皮細胞用（ET-UV、三光純薬）を用い、2日おきに交換した。

SAチャンネルのスクリーニング；培養細胞をファイブロネクチンでコートしたカバーガラス上に培養し、通常のパッチクランプ法を用いて、チャネ

ル活性の変化を記録した。結果はPC-ATに取り込んで解析した。

結果

細胞を低浸透圧下におくと活性が上昇するチャンネルがみられた。このチャンネルは、膜電位が+80mVで、約50pSのコンダクタンスを示し、ピペット内の陰圧を増加させたときに活性化されるチャンネルと同じものと思われる。

この際、細胞体積が増加したかどうかに関しては、平面的な解析結果からは、はっきりした結果が得られなかった。同時に、細胞内カルシウムイオンの上昇を測定したところ、カルシウムイオンの増加が同時に起こるような傾向がみられたが、増加する部位の分布、増加量など定量的な結果を得るまでにはいたらなかった。現在、細胞膜を蛍光色素で染色し、3次元（縦方向）での細胞体積変化とカルシウム量の変化を解析中である。

考察

低浸透圧下でのチャンネル活性の増加はこのチャンネルの機能が細胞体積調節に関与している可能性を強く示唆するものである。この際、カルシウムイオンの上昇が同時に起こることが定量的に証明されれば、チャンネル活性化に伴う細胞内カルシウム上昇がトリガーとなり、多くの細胞機能が調節されていることが証明できる。

自由：34

霊長類のクモ膜下腔を用いた脳脊髄液動態の検討

加藤文彦・川上紀明・松山幸弘（名古屋大学・整形外科）

脳脊髄液には拍動を認めるが、どのような動態と流れで還流されているかはまだ不明である。一方、近年超音波エコー機器の発達により、ヒトの手術中に脊髄の形態、拍動が観察可能となり、手術の予後予測に役立てられている。また最近、心臓超音波エコーによる心臓機能判定のために超音波エコー用の造影剤（アルブネックス）が市販され臨床で用いられている。アルブネックスが脳脊髄液の動態観察に利用可能か否かを検討し、髄液動態を解明することを研究目的とした。

アルブネックスは心臓超音波エコーによる心臓機能判定のために超音波エコー用の造影剤として開発されたもので、すでに市販され臨床で用いら